



DEUTSCHES  
PATENTAMT

②1 Aktenzeichen: P 36 02 999.8  
②2 Anmeldetag: 31. 1. 86  
④3 Offenlegungstag: 7. 8. 86

DE 3602999 A1

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
01.02.85 JP 16552/85

⑦1 Anmelder:  
Hitachi, Ltd., Tokio/Tokyo, JP

⑦4 Vertreter:  
Pagenberg, J., Dr.jur., Rechtsanwalt.; Bardehle, H.,  
Dipl.-Ing., Pat.-Anw.; Frohwitter, B., Dipl.-Ing.,  
Rechtsanw.; Dost, W., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;  
Altenburg, U., Dipl.-Phys., Pat.-Anw.; Kroher, J., Dr.,  
Rechtsanw.; Geißler, B., Dipl.-Phys.Dr.-jur., Pat.- u.  
Rechtsanw., 8000 München

⑦2 Erfinder:  
Nomura, Yasushi, Mito, Ibaraki, JP; Makiguchi,  
Kyoko, Katsuta, Ibaraki, JP

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Immunoassayreagens und Immunoassayverfahren

Mikrokapseln, in die ein Chelatbildner eingebaut ist, werden entweder mit einem Antigen oder einem Antikörper markiert. Diese Mikrokapseln werden zusammen mit einem Metallsalz, einem Ergänzender und einer einen zu bestimmenden Antikörper oder ein zu bestimmendes Antigen enthaltenden Probe in ein Reaktionsgefäß eingebracht. Durch die dadurch ausgelöste immunologische Reaktion wird der Chelatbildner aus den Mikrokapseln freigesetzt und bindet das Metallion unter Färbung. Die gefärbte Reaktionslösung wird dann photometrisch bestimmt und die Konzentration des zu bestimmenden Antikörpers oder Antigens über die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge ermittelt. Die Erfindung ermöglicht ein Immunoassayverfahren mit geringsten Meßfehlern.

DE 3602999 A1

PATENT- UND RECHTSANWÄLTE  
BARDEHLE · PAGENBERG · DOST · ALTENBURG · FROHWITTER  
& PARTNER

RECHTSANWÄLTE  
JOCHEN PAGENBERG DR JUR LL M HARVARD\*\*  
BERNHARD FROHWITTER DIPL.-ING.\*\*  
JÜRGEN KROHER DR JUR LL M QUEEN'S UNIV \*

PATENTANWÄLTE - EUROPEAN PATENT ATTORNEYS  
HEINZ BARDEHLE DIPL.-ING.  
WOLFGANG A. DOST DR., DIPL.-CHEM.  
UDO W. ALTENBURG DIPL.-PHYS.  
BERNHARD H. GEISSLER DIPL.-PHYS. DR. JUR  
MCL(GWU), AUCH RECHTSANWALT\* UND US ATTORNEY AT LAW\*\*\*

3602999

POSTFACH 860620 8000 MÜNCHEN 86  
TELEFON (089) 98 03 61  
TELEX 522 791 padd  
TELEFAX (089) 98 97 63  
HYPOBANK MUC 6 860 130 600 (BLZ 700 200 01)  
PGA MUC 387 37-808 (BLZ 700 100 80)  
BÜRO GALILEIPLATZ 1, 8000 MÜNCHEN 80

DATUM 31. Januar 1986  
H 6795 D/Sch/1a

P a t e n t a n s p r ü c h e

1

1. Immunoassayreagens gekennzeichnet  
durch:

5

a) Mikrokapseln, die jeweils eine entweder mit einem  
Antigen oder einem Antikörper markierte Membran  
aufweisen,

10

b) einen in den Mikrokapseln enthaltenen Chelatbildner,  
der zur Farbreaktion mit einem Metallion befähigt ist,  
und

15

c) einem Metallsalz, das eine Farbreaktion mit dem  
Chelatbildner eingeht.

20

2. Immunoassayreagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-  
net, daß als Chelatbildner 2-5-Br-2-pyridylazo-5-N-  
propyl-N-sulfopropylaminoanilin, Dimethylsulfonazo-  
III, Chromazurol B, 2-(2-thiazolylazo)-4-methyl-5-  
sulfomethylaminobenzoessäure, Nitroso-PSAP oder Batho-  
phenanthrolin enthalten ist.

- 1 3. Immunoasseyreagens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Metallsalz ein Eisen (II)-, Eisen (III)-, Zink-, Kupfer-, Barium-, Nickel-, Kobalt-, Calcium-, Magnesium oder Aluminiumsalz enthalten ist.
- 5
4. Immunoassayreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrokapseln in einer Lösung suspendiert sind und das Metallsalz in dieser Lösung gelöst ist.
- 10
5. Immunoasseyreagens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösung eine auf einen bestimmten pH-Wert eingestellte Pufferlösung vorliegt.
- 15 6. Immunoasseyreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikrokapseln Liposomen mit einer Teilchengröße von 1  $\mu$  bis 1 mm vorliegen.
- 20 7. Immunoasseyreagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich anwesend ist
- d) ein Komplement, das durch eine Reaktion zwischen dem Antigen und dessen kognatem Antikörper aktiviert wird.
- 25 8. Immunoasseyreagens zur Bestimmung eines Antikörpers oder eines Antigens, g e k e n n z e i c h n e t d u r c h :
- 30 a) Mikrokapseln, die jeweils eine entweder mit dem korrespondierenden Antigen oder Antikörper markierte Membran aufweisen, und
- b) einen in den Mikrokapseln enthaltenen Chelatbildner, der zur Farbreaktion mit einem Metallion befähigt ist.
- 35 9. Immunoasseyreagens nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrokapseln in trockener Form vorliegen.

110. Immunoassayreagens nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrokapseln in einer Flüssigkeit suspendiert sind.

511. Immunoassayverfahren gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

10 a) Mischen von Mikrokapseln, die jeweils eine mit einem Antigen markierte Membran aufweisen und einen Chelatbildner enthalten, einem Metallsalz, das zur Reaktion mit dem Chelatbildner befähigt ist, einem Komplement und einer den Antikörper enthaltenden Probe,

15 b) Freisetzen des Chelatbildners aus den Mikrokapseln durch eine Antigen/Antikörper-Reaktion, und

20 c) optische Antikörper-Bestimmung mittels der Färbung, die durch die Reaktion zwischen dem Chelatbildner und dem Metallion verursacht wird.

12. Immunoassayverfahren, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

25 a) Mischen von Mikrokapseln, die jeweils eine mit einem Antigen markierte Membran aufweisen und einen Chelatbildner enthalten, einem Metallion, das zur Reaktion mit dem Chelatbildner befähigt ist, einem Komplement und einer das Antigen enthaltenden Probe,

30 b) Freisetzen des Chelatbildners aus den Mikrokapseln durch eine Antigen/Antikörper-Reaktion, und

35 c) optische Antigen-Bestimmung in der dadurch gefärbten Reaktionsflüssigkeit.

1 HITACHI, LTD.  
6, Kanda Surugadai 4-chome  
Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

31. Januar 1986  
H 6795 - D/Sch/h1

5

B e s c h r e i b u n g

10

Immunoassayreagens und Immunoassayverfahren

15 Die Erfindung bezieht sich auf ein Immunoassayreagens und auf ein Immunoassayverfahren, wobei insbesondere Mikrokapseln mit jeweils einer entweder mit einem Antigen oder einem Antikörper markierten Membran eingesetzt werden.

W 20 Typische Immunoassayverfahren, die in der Praxis eingesetzt wurden, sind z.B. Radioimmunoassays, wobei man in einer aus vitalem Gewebe gewonnenen Probe ein Antigen über eine Antigen/Antikörper-Reaktion zwischen einem mit einem Radioisotop markierten Antikörper und diesem Antigen bestimmt. Weil dieses Verfahren jedoch mühsam ist, wurden Immunoassayverfahren auf der Basis der Absorptionsspektroskopie unter Verwendung von Mikrokapseln vorgeschlagen. Zum Beispiel beschreibt US-PS 4 342 826 ein Immunoassayverfahren, bei dem man ein Liposom, das eine Lipidmembran aufweist und dort ein Enzym trägt, mit einem Antigen oder einem Antikörper 30 markiert, eine Probe mit diesem Liposom mischt, um dabei dessen Membran mit einer immunologischen Reaktion aufzubrechen, das Enzym mit einem Substrat reagieren läßt, und schließlich die Konzentration an Antikörper oder Antigen der Reaktions- 35 flüssigkeit mit einem Photometer bestimmt.

1 Jedoch zeigen die dabei mit einer enzymatischen Reaktion erhaltenen Daten eine gewisse probenabhängige Streuung, die zu ernsthaften Fehlern führt.

5 <sup>4</sup> Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Immunoassays, mit dem eine Probe mit geringstmöglichen Fehlern analysiert werden kann, auch wenn sie ein Substrat oder ein Enzym enthält und die Bereitstellung eines Immunoassayreagenses für dieses  
10 Immunoassayverfahren.

In dem erfindungsgemäßen Immunoassayverfahren wird keine enzymatische Reaktion eingesetzt. Wenn nämlich eine  
15 Serumprobe ein Substrat oder Enzym enthält, würde ein Substrat oder Enzym, das durch den Fortgang der Antigen/Antikörper-Reaktion aus der Mikrokapsel freigesetzt wird, ebenso mit dem oben erwähnten, aus der Probe herrührendem Substrat oder Enzym reagieren, und dabei einen großen Reaktionsuntergrund entstehen lassen, woraus sich häufig  
20 eine deutliche Abnahme der Analysengenauigkeit ergibt.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Immunoassayreagens unter Verwendung von Mikrokapseln zur Verfügung, die jeweils eine entweder mit einem Antigen oder einem Antikörper  
25 markierte Membran aufweisen (im folgenden als markierte Mikrokapseln bezeichnet) und die einen Chelatbildner enthalten, der bei der Koordinierung mit einem Metallion eine Färbung zeigt.

30 Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin ein Immunoassayreagens zur Verfügung, das folgendes beinhaltet: markierte Mikrokapseln; einen in diesen markierten Mikrokapseln enthaltenen Chelatbildner, der bei der Koordinierung mit einem Metallion eine Färbung zeigt;  
35 und eine Flüssigkeit, in der diese Mikrokapseln dispergiert werden und in der das Metallion außerhalb der Mikrokapseln eingesetzt werden kann.

1 Schließlich stellt die vorliegende Erfindung ein Immuno-  
assayverfahren bereit, in dem folgendes inbegriffen ist:  
Mischen von markierten, einen Chelatbildner enthaltenden  
Mikrokapseln, einem zur Reaktion mit diesem Chelatbildner  
5 befähigten Metallsalz, einem Komplement und  
einer einen Antikörper oder ein Antigen enthaltenden  
Probe; Freisetzen des Komplexbildners aus den Mikro-  
kapseln durch die dadurch ausgelöste Antigen/Antikörper-  
Reaktion; und Bestimmung des durch die Reaktion zwischen  
10 dem Chelatbildner und dem Metallsalz erhaltenen Produktes,  
um dadurch das Antigen oder den Antikörper in der Probe  
zu analysieren.

Da in einer Vitalprobe kein Chelatbildner entsteht, ver-  
15 ursacht die Probe nur einen vergleichsweise geringen  
Reaktionshintergrund, wodurch das Signal/Rausch-Verhältnis  
bedeutend angehoben wird.

Fig. 1 zeigt eine Kalibrierkurve zur erfindungsgemäßen  
20 Bestimmung von AntiT4-Antikörper.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Mikrokapseln  
können z.B. aus Liposomen bestehen, von denen jedes eine  
dünne Membran aufweist. Zur Bestimmung des Antigens wird  
25 diese Membran mit dem kognaten Antikörper markiert.  
Umgekehrt wird zur Bestimmung eines Antikörpers die  
Membran mit dessen kognatem Antigen markiert.

Diese Mikrokapseln werden nach einem Verfahren hergestellt,  
30 das in "Methods in Enzymology", 74, 152-161 (1981) beschrie-  
ben ist. Dabei werden Sphingomyelin, Cholesterin, Dicetyl-  
phosphat und Thyroxin (T4) in Methanol gelöst. Das Löse-  
mittel der erhaltenen Lösung wird im Vakuum auf einer Glas-  
platte verdampft, wobei auf dieser eine trockene Lipid-  
35 Membran entsteht. Dann wird die mit Thyroxin - einem Anti-  
gen - markierte Membran durch Rühren in einem Mixer mit  
einer Lösung des Chelatbildners von bestimmter Konzentra-

- 1 tion gemischt, um das Lipid zu emulgieren. Auf diese Weise wird der Chelatbildner in jeder Mikrokapsel eingeschlossen. Die Lipidmembran bildet ein Liposom mit einer hydrophilen äußeren Oberfläche. Die so erhaltenen Liposomen werden
- 5 durch das Auswaschen von Verunreinigungen gereinigt. Jedes Liposom hat bevorzugt eine Teilchengröße von 1  $\mu$  ( $\mu$ m) bis 1 mm, obwohl einzelne Teilchen auch Größen außerhalb dieses Bereiches aufweisen können.
- 10 Zusätzlich zu Liposomen können auch Erythrocyten vom Schaf und Nylonkapseln als Mikrokapseln eingesetzt werden. Diese Mikrokapseln können getrocknet werden und in Form eines granulierten oder tablettierte Immunoassayreagenses aufbewahrt werden. Alternativ kann man zur Zubereitung eines Immuno-
- 15 assayreagenses die Liposomen auch in einer Pufferlösung von geeignet eingestelltem pH-Wert suspendieren. Zusätzlich zu den Liposomen muß dieses flüssige Reagens weiterhin ein Komplement und ein Metallsalz enthalten. Tabelle 1 zeigt ein Beispiel für die Zusammensetzung eines solchen
- 20 flüssigen Immunoassayreagenses.

Tabelle 1

25	Liposom	T4-bindende Liposome mit einem Gehalt von 10 m M 5-Br-PAPS
	Komplement	gepooltes Meerschweinchen-Serum
30	Metallsalz	100 mM FeCl <sub>2</sub>
	Pufferlösung	10 mM Veronalpufferlösung (pH 7,4)
35	Bei der Verwendung von 2-5-Br-2-pyridylazo-5-N-propyl-N-sulfopropylaminoanilin (nachfolgend als 5-Br-PAPS bezeichnet) als Chelatbildner eignen sich FeCl <sub>2</sub> und	



- 1  $\text{ZnCl}_2$  als Metallsalze, und die Extinktion kann bei 552 nm  
gemessen werden; verwendet man Dimethylsulfonazo-III  
als Chelatbildner, eignet sich als Metallsalz  $\text{BaCl}_2$  (Be-  
stimmung der Extinktion bei 655 nm); verwendet man Chrom-
- 5 azurol B als Chelatbildner, eignet sich  $\text{FeCl}_3$  als Metall-  
salz (Bestimmung der Extinktion bei 630 nm); verwendet man  
2-(2-Thiazolylazo)-4-methyl-5-sulfomethylaminobenzoessäure  
(nachfolgend als TAMSMB bezeichnet) als Chelatbildner,  
eignet sich  $\text{CuCl}_2$  als Metallsalz (Bestimmung der Extinktion
- 10 bei 585 nm); verwendet man Nitroso-PSAP als Chelatbildner,  
eignet sich  $\text{FeCl}_2$  als Metallsalz (Bestimmung der Extinktion  
bei 756 nm); verwendet man Bathophenanthrolin (nachfolgend  
als BFT bezeichnet) als Chelatbildner, eignet sich  $\text{FeCl}_2$   
als Metallsalz (Bestimmung der Extinktion bei 535 nm).
- 15 Jeder Chelatbildner zeigt eine Färbung bei der Koordinie-  
rung mit einem Metallion, insbesondere einem Schwermetall-  
ion, wodurch die optische Bestimmung mit einem Photometer  
ermöglicht wird.
- 20 Eisen-, Aluminium-, Magnesium-, Calcium-, Nickel- und  
Kobalt-Salze sind Beispiele für Metallsalze, die in der Lö-  
sung enthalten sein können, welche mit der Probe zu mi-  
schen ist, um dadurch eine Antigen/Antikörper-Reaktion aus-  
zulösen. Bei der Vermischung einer Mikrokapsel mit einer
- 25 Probe, die das zu bestimmende Antigen oder den zu bestimmen-  
den Antikörper enthält, erfolgt eine Antigen/Antikörper-  
Reaktion zwischen zu bestimmendem Antigen oder zu bestimmen-  
dem Antikörper und dem Antigen oder Antikörper, mit dem  
die Membran der Mikrokapsel markiert ist. Danach greift
- 30 ein auf diese Weise aktiviertes Komplement die  
Membran der Mikrokapsel an, um sie aufzulösen. Auf diese  
Weise wird der in der Mikrokapsel enthaltene Chelatbildner  
daraus freigesetzt und reagiert mit dem Metallion außerhalb  
der Mikrokapsel. Daraufhin weist der Chelatbildner eine
- 35 Färbung auf, die von dem Ausmaß dieser Freisetzung abhängig  
ist. Da die Anzahl der aufgebrochenen Mikrokapseln der Men-  
ge von Antigen oder Antikörper in der Probe direkt propor-

1 tional ist, kann man die Konzentration an Antigen oder Antikörper entsprechend der Färbung bestimmen, was über eine vorher aufgenommene Kalibrierkurve geschieht.

5 Das Komplement, das mehrere Bestandteile enthält, erkennt eine immunologische Reaktion und löst die Liposom-Membran auf. Üblicherweise verwendet man als Komplement Meerschweinchen-Serum.

10 Die vorliegende Erfindung eignet sich zur Detektion vieler Antigen/Antikörper-Reaktionen. Typische Beispiele für Antigene sind T4, T3, Globulin und IGG.

15 Die Erfindung wird durch das folgende Beispiel weiter beschrieben.

Man bereitet eine Lösung von 5-Br-PAPS - einem Chelatbildner - mit einer Konzentration von 10 Mol/l, die in die Mikrokapseln eingebracht werden muß. Hierzu dispergiert man ein zur Markierung mit einem Antigen oder einem Antikörper befähigtes Lipid in dieser Lösung, wodurch eine Anzahl von Liposomen erhalten wird, in denen der Chelatbildner nunmehr eingeschlossen ist. Die äußere Oberfläche der erhaltenen Liposomen wird durch wiederholtes Auswaschen von Verunreinigungen gesäubert. Dann markiert man die Oberfläche jeder Mikrokapsel mit Thyroxin (T4).

Man dispergiert 0,001 ml der so erhaltenen Mikrokapseln in einer isotonischen Lösung, die 0,154 Mol/l Natriumchlorid enthält, gibt 100 mM Eisenchlorid ( $\text{FeCl}_2$ ) und 20  $\mu\text{l}$  eines Komplements dazu und stellt das Gesamtvolumen auf 1 l ein. Die Reaktionslösung kann in einem Behälter aufbewahrt und bei Bedarf als Immunoassayreagens verwendet werden.

35 Man bestückt den Probenaufnehmer (sampler) eines klinischen Analysenautomaten mit Probengefäßen, die eine Serumprobe enthalten, hält die Reaktionsstrecke bei 37 °C und bringt

1 Reaktionsgefäße beweglich intermittierend in die Reaktions-  
strecke, in der ein Probenpipettiersystem, ein Reagensver-  
sorgungssystem und ein Vielfachwellenlängen-Photometer vor-  
handen sind. Durch das Probenpipettiersystem werden jeweils  
5 10 µl der Serumprobe aus den Probengefäßen pipettiert und  
in die Reaktionsgefäße der Reaktionsstrecke überführt. Durch  
das Reagensversorgungssystem werden jeweils 2 ml des nach  
obiger Vorschrift hergestellten Reagens in die Reaktions-  
gefäße eingebracht. Anschließend werden die Reaktionsgefäße  
10 bei gleichzeitiger Weiterbeförderung inkubiert. Nach 30 min  
erreicht jedes Reaktionsgefäß zusammen mit der Reaktions-  
flüssigkeit die Stelle der photometrischen Messung, wo die  
Reaktionsflüssigkeit, zur Bestimmung ihrer Extinktion bei  
522 nm, bestrahlt wird. Das Ergebnis der Messung wird in  
15 einem Rechner ermittelt und die Konzentration an AntiT4-  
Antikörper in der Probe ausgedruckt.

Fig. 1 zeigt eine Kalibrierkurve, die man erhält, wenn das  
Reaktionsgefäß mit der oben erwähnten Reagenslösung, mit  
20 Antikörper-freiem Serum und mit AntiT4-Antikörper bekannter  
Konzentration beschickt wird. Diese Blindprobe zeigt einen  
Mittelwert von 0,04 µM/l und eine Varianz von 0,02 µM/l.  
Die Reproduzierbarkeit bei einer mittleren Antikörper-  
Konzentration von 15 µM/l zeigt eine Standardabweichung von  
25 0,02 µM/l. Die Empfindlichkeit im Hinblick auf den Serum-  
spiegel ist in diesem Reaktionssystem  $2 \times 10^{-8}$  M/l.

Tabelle 2 zeigt einen Vergleich zwischen dem Ergebnis einer  
Antikörperbestimmung unter Verwendung der in Fig. 1 gezeigten  
30 Kalibrierkurve und jenem eines herkömmlichen Verfahrens,  
wobei durch Einschluß eines Enzyms in Liposome derselbe AntiT4-  
Antikörper bestimmt wird.

Tabelle 2

1

Antikörper- Konzentration	Standardabweichung	
	erfindungsgemäßes Verfahren	herkömmliches Verfahren
1 $\mu\text{M}$	0,11 $\mu\text{M}$	0,65 $\mu\text{M}$
15 $\mu\text{M}$	0,02 $\mu\text{M}$	0,42 $\mu\text{M}$

10

Wie bereits beschrieben, verringert die vorliegende Erfindung entscheidend die aus der Probe resultierenden Fehler, wobei die Genauigkeit des Immunoassays verbessert wird. Dadurch werden Ultramikroanalysen ermöglicht.

15

20

25

30

35

- 12 -

- Leerseite -

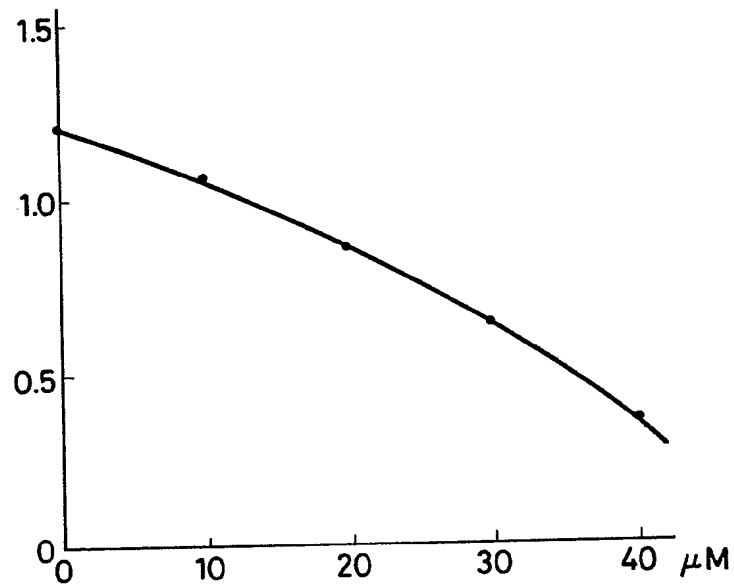
31.01.86

-13-

Nummer:  
Int. Cl.4:  
Anmeldetag:  
Offenlegungstag:

36 02 999  
G 01 N 33/532  
31. Januar 1986  
7. August 1986

FIG. 1





## Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

### Description

Immunoassayreagens and Immunoassayverfahren the invention a Immunoassayreagens refers and to a Immunoassayverfahren to, whereby in particular microcapsules with in each case one are used either with an antigen or an antibody labeled membrane.

Typical Immunoassayverfahren, which was in practice used, e.g. is. Radioimmunoassay, whereby one determines an antigen in out vital fabric a won sample over antigen/anti-body reaction between antibody labeled with a radioisotope and this antigen. Because this method is however laborious, Immunoassayverfahren on the base of the absorption spectroscopy were suggested using microcapsules. For the example US-PS describes 4,342,826 a Immunoassayverfahren, with which one mixes a liposome, which exhibits a Lipidmembran and carries an enzyme there, with an antigen or an antibody labeled, a sample with this liposome, in order to break thereby its membrane open with an immunological reaction, the enzyme with a substrate to react leaves, and finally the concentration at antibodies or antigen of the reaction liquid with a photometer determines.

EMI 4.1

EMI 5.1

However the data received thereby with an enzymatic reaction show a certain rehearse-dependent scattering, which leads to serious errors.

A task of the present invention is the supply of a Immunoassays, with which a sample with lowest possible errors can be analyzed, even if it contains a substrate or an enzyme and the supply of a Immunoassayreagenses for this Immunoassayverfahren.

In the Immunoassayverfahren according to invention no enzymatic reaction is used. If a serum sample contains a substrate or an enzyme, a substrate became or enzyme, which is set free by the continuation the antigens anti-body reaction from the microcapsule, likewise with the substrate or enzyme which is due mentioned above from the sample to react, and a large reaction underground develop to let, from which frequently a clear reduction of the analysis accuracy results.

The present invention makes available a Immunoassayreagens using microcapsules, which exhibit one in each case either with an antigen or an antibody labeled membrane (in the following called labeled microcapsules) and some chelating agent contain, which shows a marking with the coordination with a Metallion.

The present invention makes available further a Immunoassayreagens, which contains the following: labeled microcapsules; a chelating agent contained in these labeled microcapsules, which shows a marking with the coordination with a Metallion; and a fluid, in which these microcapsules are dispersed and in that the Metallion outside of the microcapsules be used can.

Finally the present invention a Immunoassayverfahren makes available, in which the following is included: Mix from labeled, microcapsules containing a chelating agent, a metal salt enabled for the reaction with this chelating agent, a complement and an antibody or an antigen containing sample; Set the complexing agent from the microcapsules by the antigen/antibody released thereby reaction free; and identification of the product received by the reaction between the chelating agent and the metal salt, in order to analyze thereby the antigen or the antibody in the sample.

▲ top Since in a vital sample no chelating agent develops, the sample causes only a comparatively small reaction background, whereby the signal/intoxication relationship is importantly raised.

Fig. 1 points a calibration curve to the according to invention  
Identification of AntiT4-Antikörper.

The microcapsules used in the present invention can e.g. of liposomes consist, of which everyone exhibits a thin membrane. The identification of the antigen this membrane with the kognaten antibody becomes labeled.

To the identification of an antibody the membrane with its kognatem antigen labeled is turned around.

These microcapsules are manufactured after a method, which is described in ?Methods in Enzymology?, 74, 152-161 (1981). Sphingomyelin, cholesterol, Dicetylphosphat and thyroxin (T4) in methanol are loosened. The solvent of the received solution in the vacuum on a glass panel is evaporated, whereby on this dry Lipid develops a membrane. Then with one < RTI ID=6.1> Thyroxin einem< /RTI> Antigen - labeled membrane by agitating in a mixer with a solution of the chelating agent of certain Konzentration mixed, around the Lipid < RTI ID=7.1> zu'ernulgieren.< /RTI> In this way the chelating agent is < in; RTI ID=7.2> each microcapsule eingeschlossen.< /RTI>

The Lipidmembran forms a liposome with a hydrophilic outside surface. In such a way received liposomes by the washing out by impurities are cleaned. Each liposome has prefers a particle size of < RTI ID=7.3> 1 m (GM) < /RTI> until 1 mm, although individual particles can exhibit also values outside of this range.

Additionally to liposomes also Erythrocyten by the sheep and nylon caps can be used as microcapsules. These microcapsules can be dried and in form one < RTI ID=7.4> aranulier < /RTI> ten or tablettierten Immunoassayreagenses < RTI ID=7.5> aufbewahrt< /RTI> become. Alternatively one can suspend for the preparation of a Immunoassayreagenses liposomes also in a buffer solution of been suitable adjusted pH value. Additionally to the liposomes this liquid reagent must contain further a complement and a metal salt. Table 1 shows an example of the composition of such liquid Immunoassayreagenses.

Table 1 liposome T4-bindende of liposomes with a content of

10 m M 5-Br-PAPS complement of gepooltes < RTI ID=7.6> Eerschweinchen Serum< /RTI> Metal salt 100 mm FeCl2 buffer solution 10

mm of Veronalpufferlösung (pH 7.4) with the use of < RTI ID=7.7> 2-5-Br-2-pyridylazo-5-N-propyl-< /RTI> N-sulfopropylaminoanilin (in the following called 5-Br-PAPS) as chelating agents are suitable < RTI ID=7.8> FeCl<sub>2</sub>< /RTI> and < RTI ID=8.1> ZnCl<sub>2</sub> as metal salts, and the extinction can with 552 Nm  
 2 to be measured; uses one Dimethylsulfonazo III< /RTI> as chelating agent, is suitable as metal salt BaCl<sub>2</sub> (< RTI ID=8.2> stimmungder< /RTI> Extinction with 655 Nm); if one uses Chromazurol B as chelating agent, FeCl<sub>3</sub> is suitable as metal salt (identification of the extinction with 630 Nm); uses one < RTI ID=8.3> 2 - (2-Thiazolylazo) -4-methyl-5-sulfomethylaminobenzoessäure< /RTI> (in the following < as; RTI ID=8.4> TAMSMB< /RTI> designated) as chelating agents, CuCl<sub>2</sub> is suitable as metal salt (identification of the extinction with 585 Nm); if one uses Nitroso PSAP as chelating agent, FeCl<sub>2</sub> is suitable as metal salt (identification of the extinction with 756 Nm); if one uses Bathophenanthrolin (in the following called BFT) as chelating agent, FeCl<sub>2</sub> is suitable as metal salt (identification of the extinction with 535 Nm).

Each chelating agent shows a marking with the coordination with a Metallion, in particular a Schwermetallion, whereby the optical identification with a photometer is made possible.

Iron, aluminum, magnesium, calcium, nickel and cobalt salts are examples of metal salts, which can in the solution be contained, which is to be mixed with the sample, in order to release thereby antigen/anti-body reaction. During the mixture of a microcapsule with a sample, which contains the antigen which can be determined or the antibody which can be determined, antigen/antibody reaction between antigen which can be determined or to determining antibody and the antigen or antibody takes place, is labeled with which the membrane of the microcapsule. Afterwards a in this way activated complement attacks the membrane of the microcapsule, in order to dissolve it. In this way the chelating agent from, it contained in the microcapsule, is set free and reacted with the Metallion outside of the microcapsule. Thereupon the chelating agent exhibits a marking, which is dependent on the extent of this release. Since the number of broken open microcapsules of the quantity of antigen or antibody is direct in the sample proportional, one knows the concentration at antigen or antibodies according to the marking to determine, what takes place over a before taken up calibration curve.

The complement, < RTI ID=9.1> mehrere< /RTI> , Recognizes an immunological reaction contains components and dissolves the Liposom membrane.

usually one uses as complement < RTI ID=9.2> ivleerschweinchen < /RTI> Serum.

The present invention is suitable for the detection many antigen/anti-body reactions. Typical examples of antigens are T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, globuline and IGG.

The invention is continued to describe by the following example.

One prepares a solution of 5-Br-PAPS-einemChelatbildner with a concentration of 10 Mol/l, which must be brought into the microcapsules. For this one disperses a Lipid in this solution, qualified for the tag with an antigen or an antibody, whereby a number will receive from liposomes, indenender chelating agent now < RTI ID=9.3> Inge lock NIST. Die< /RTI> outside surface received liposomes is cleaned by repeated washing out by impurities. Then labeled one the surface of each microcapsule with thyroxin (T<sub>4</sub>).

One disperses 0.001 ml in such a way received microcapsules in a isotonischen solution, which contains 0.154 Mol/l sodium chloride, gives 100 mm iron perchloride (FeCl<sub>2</sub>) and 20 < RTI ID=9.4> ssl< /RTI> one < RTI ID=9.5> öinplenaents< /RTI> in addition and the total volume adjusts to 1 l.

The reaction solution can be kept in a container and used if necessary as Immunoassayreagens.

One equips the sample receiver (more sampler) of a clinical automatic analyzer with < RTI ID=9.6> Sample containers, < /RTI> the one serum sample contained, keeps the reaction distance < with 37; RTI ID=9.7> ?C< /RTI> and brings Reaction containers movable intermittent into the reaction distance, in which a sample pipetting system, a test utility system and a multiple wavelength photometer are present. 10 is < by the sample pipetting system in each case; RTI ID=10.1> Wl< /RTI> transfers of the serum sample from the sample containers pipetted and into the reaction containers of the reaction distance. 2 is brought by the test utility system in each case ml according to above regulation manufactured reagent into the reaction containers. Subsequently, the reaction containers are inkubiert with simultaneous reforwarding. After 30 min reaches each reaction container as well as the reaction liquid the place of the photometric measuring, where the reaction liquid, to the identification of its extinction with 522 Nm, is illuminated. The result of the measuring is determined in a computer and the concentration at AntiT<sub>4</sub> antibody in the sample is printed out.

Fig. 1 shows a calibration curve, which one receives, if the reaction container with the test solution mentioned above, with anti-body-free serum and with AntiT<sub>4</sub>-Antikörper well-known concentration is fed. This Blindprobe shows an average value of 0,04 < RTI ID=10.2> ssM/l< /RTI> and a variance of 0,02 < RTI ID=10.3> ssM/l.< /RTI>

The reproducibility with middle antibodies a concentration of 15 < RTI ID=10.4> ssM/l< /RTI> a standard deviation of 0,02 shows < RTI ID=10.5> ssM/l.< /RTI> The sensitivity regarding the serum mirror is < in this reaction system 2 x; RTI ID=10.6> io8 M/l.< /RTI>

Table 2 shows a comparison between the result of an anti-body regulation using in Fig. 1 calibration curve and that one shown of a conventional method, whereby < RTI ID=10.7> durchEinschlusseines< /RTI> Enzyme in < RTI ID=10.8> Liposome< /RTI> the same AntiT<sub>4</sub> antibody is determined.

Table 2  
 EMI11.1

< tb> Anti-body < SEP> Standard deviation	< tb> Concentration
< tb> < SEP> according to invention < SEP> conventional	
< tb> < SEP> Method < SEP> Method	
< tb> < SEP> 1 < SEP> < RTI ID=11.1> M< /RTI> < SEP> 0,11 < SEP> < RTI ID=11.2> M< /RTI> < SEP> 0,65 < SEP> < RTI ID=11.3> M< /RTI> < SEP>	
< tb> < SEP> 15 < SEP> < RTI ID=11.4> M< /RTI> < SEP> 0,02 < SEP> < RTI ID=11.5> M< /RTI> < SEP> 0,42 < SEP> M < SEP>	
< tb> As already described, the present invention reduces crucially the errors resulting from the sample, whereby the accuracy of the Immunoassays is improved. Thus ultra-microanalyses are made possible.	

- Empty sheet